



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA VOLUNTÁRIA – PICVOL

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE
MEMBRANAS BIOATIVAS CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO

Área do conhecimento: Ciências da Saúde

Subárea do conhecimento: Medicina

Especialidade do conhecimento: Caracterização fenotípica e genotípica de isolado de
Leishmania obtidos de pacientes refratários ao tratamento com antimonial

Relatório Final

Período de agosto/2018 a julho/2019

PICVOL

Orientador: Diego Moura Tanajura

Autor: Tiago da Silva Nunes

RESUMO

Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) apresenta lesões ulcero-crostosas localizadas na pele, sendo a *Leishmania braziliensis* a principal espécie associada a LCL. O tratamento de primeira linha são os Antimoniais Pentavalentes, que possuem alta toxicidade sistêmica, havendo, então, estímulo no desenvolvimento de novos tratamentos tão eficazes, mas com menos efeitos colaterais. Assim, o Sistema de Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em Lipossomo (M+AUl) apresenta-se como proposta de tratamento, frente suas capacidades anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante e leishmanicida. Diante disto, o presente estudo objetivou avaliar o potencial *in vitro* do sistema como nova forma de tratamento para LCL por *L. braziliensis*. Para isto, avaliou-se a viabilidade parasitária após exposição do tratamento, notando-se redução significativa da viabilidade parasitária segundo efeito dose dependente da concentração do AU. Ademais, constatou-se que esta forma de tratamento mostrou um caráter irreversível após a retirada do tratamento. Macrófagos humanos, por sua vez, expostos ao presente sistema, não havendo redução da viabilidade celular nas concentrações de AU testadas. Por fim, o tratamento com o sistema M+AUl reduziu irreversivelmente a infecção e a carga parasitária de macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Frente aos dados expostos, é possível afirmar que o Sistema de M+AUl é uma potencial opção terapêutica para LCL causada por parasitos da espécie *L. braziliensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose Cutânea; Membranas Bioativas; Ácido Úsnico.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	OBJETIVOS.....	9
	2.2 Objetivo Geral.....	9
	2.3 Objetivos Específicos.....	9
3	METODOLOGIA	10
	3.1 Obtenção e cultura de <i>Leishmania braziliensis</i>	10
	3.2 Obtenção das Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo	10
	3.3 Análise da viabilidade de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> tratados com diferentes concentrações de Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo na Membrana de Gelatina	11
	3.4 Análise da viabilidade de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> após o tratamento com diferentes concentrações de Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo na Membrana de Gelatina	11
	3.5 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)	11
	3.6 Análise da infecção de macrófagos humanos e da carga parasitária obtidos de PBMC tratados com o sistema de Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo.....	12
	3.7 Avaliação da viabilidade dos parasitos intracelulares após o tratamento com o sistema de Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo	12
	3.8 Análise Estatística	13
	3.9 Aspectos Éticos	13
4	RESULTADOS.....	14
	4.1 Tratamento com Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo reduz a viabilidade do isolado de <i>L. braziliensis</i>	14

4.2	Tratamento com Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo reduz de forma irreversível a viabilidade do isolado de <i>L. braziliensis</i>	15
4.3	Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo não apresenta citotoxicidade em macrófagos humanos	16
4.4	Tratamento com Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo reduz a taxa de infecção por <i>L. braziliensis</i> em macrófagos humanos.....	17
5	DISCUSSÃO	20
6	CONCLUSÕES	26
7	PERSPECTIVAS DE FUTUROS TRABALHOS	27
	ATIVIDADES REALIZADAS DE AGOSTO/18 A JULHO/19	34
	OUTRAS ATIVIDADES	35

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose corresponde a um grupo de doenças infectoparasitárias causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, protozoários intracelulares. A depender da extensão do acometimento no indivíduo, pode-se classificar a leishmaniose em sua forma visceral ou tegumentar (DANTAS-TORRES, 2006). No que diz respeito a forma tegumentar, esta pode ser subclassificada em quatro formas clínicas: cutânea localizada, cutânea disseminada, cutânea difusa e mucosa. Destas, a forma cutânea localizada é a mais frequente na população (JIRMANUS et al., 2012; DNDi, 2016).

A transmissão da doença se dá através da picada da fêmea dos mosquitos da família *Psychididae* (*Phlebotomus* e *Lutzomyia*) durante o repasto sanguíneo, momento ao qual é inoculada a forma flagelada do parasito, denominada promastigota (WHO, 2016). No organismo humano, o parasito infecta células do Sistema Mononuclear Fagocitário e então assume sua forma aflagelada, denominada amastigota. Então, o parasito expande sua população e, em novo repasto sanguíneo pelo mosquito, este se infecta com as formas amastigotas do parasito, possibilitando assim a propagação da doença (BANULS et al., 2007; HANDMAN, 1999).

A Leishmaniose Cutânea (LC) apresenta ampla distribuição geográfica, sendo considerada endêmica em diversas regiões do mundo, cerca de 600.000 – 1.000.000 de casos novos ao ano (DNDi, 2016). Estima-se que cerca de dois terços dos casos de LC estejam concentrados em 6 países, Afeganistão, Algeria, Brasil, Colômbia, Irã e Síria (WHO, 2015). No Brasil, a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) é a forma mais comum da doença, sendo responsável por aproximadamente 90% dos casos na região Nordeste, acometendo geralmente homens jovens adultos que trabalham no campo (JIRMANUS et al., 2012; DNDi, 2016)

Embora a mortalidade associada a LC não seja expressiva, esta forma clínica se associa a grande estigmatização do doente em decorrência das lesões que apresenta (WHO, 2016). Esta, por sua vez, ocorre, pois, em geral as lesões estão presentes em áreas expostas do corpo do paciente, em braços, pernas e face (MEARS et al., 2015). Quanto a apresentação clínica, as lesões se apresentam inicialmente como pápulas eritematosas de cerca de 5 – 10 mm de diâmetro, mas que podem eclodir em lesões ulcero-crostosas de bordas elevadas e fundo recoberto por material exsudativo. No entanto, na maioria dos

casos, as lesões são autolimitadas, curando-se num período entre 3 – 18 meses, a depender a espécie do parasito ou do estado do sistema imune do hospedeiro, embora quase sempre resultem numa cicatriz desconfigurante no local, principal responsável pelo estigma associado a doença (DAVID & CRAFT, 2009).

Embora diversas espécies possam ocasionar a LCL, as lesões causadas pela espécie *Leishmania braziliensis* se distingue das outras devido a cronicidade, latência e tendência de metástase no hospedeiro (BITTENCOURT et al., 2002). Isto se deve em decorrência da capacidade do parasito em persistir na cicatriz da lesão mesmo após cura espontânea ou quimioterápica, persistindo assim sua capacidade de replicação e recidiva da doença (SCHUBACH et al., 1998). Estas lesões, por sua vez, apresentam-se com uma extensa destruição de tecido local bem como apresentam risco de ocasionar a forma cutânea disseminada, caso o parasito ganhe a corrente sanguínea (MENDONÇA et al., 2004).

Atualmente, o tratamento de primeira linha para LT consiste na administração de antimoniais pentavalentes (SB^v), como o antimoniato de meglumina/Glucantime ou o estibogluconato de sódio/Pensostam. Os antimoniais interferem no metabolismo oxidativo das formas amastigotas de *Leishmania* ao promover a inibição da glicólise e da oxidação de ácidos graxos, resultando numa produção reduzida de ATP e de GTP. Ademais, estas drogas apresentam ainda outros mecanismos de ação, como ligação inespecífica aos grupos sulfidrílicos das proteínas das amastigotas (CHULAY et al., 1988; BERMAN, 1997). No entanto, o uso de SB^v está associado a significativa toxicidade em coração, fígado e rins, bem como a resistência do parasito a estas drogas (AMATO et al., 2007).

Outros tratamentos para LCL estão disponíveis, sendo possível a utilização de outras drogas como a Anfotericina B e a Miltefosina, embora estas também estejam associadas a significativa toxicidade sistêmica no hospedeiro, além de um custo elevado associado a uma eficácia variável (SANTOS et al., 2014). Além disso, estes tratamentos de segunda linha quanto o tratamento com SB^v são administrados via parenteral, embora a doença esteja localizada em macrófagos na camada dérmica da pele (VAN BOCXLAER et al., 2016).

Neste contexto, tem-se um estímulo global, através de entidades como o Comitê de Peritos da Organização Mundial da Saúde (OMS), para o desenvolvimento de novas formas de tratamento localizados para a LCL (OMS, 2013). Desta forma, abre-se caminho para novas formas de tratamento que, mesmo possuindo eficácia semelhante aos tratamentos sistêmicos atualmente empregados, estejam associadas a menores efeitos adversos (SILVA et al., 2016). Dentre algumas alternativas já desenvolvidas, formulações tópicas de paromomicina e de anfotericina B foram testadas, embora nenhuma se apresentasse completamente satisfatória em decorrência dos efeitos colaterais ou da falta de eficácia dos tratamentos (BEN SALAH et al., 2013; LAYEGH et al., 2011; NEAL et al., 1994; GONZÁLEZ et al., 2008).

Nos últimos anos, polímeros naturais têm ganhado cada vez mais espaço na área da saúde em decorrência da biocompatibilidade com tecido humanos, bem como devido a biodisponibilidade do material, além de satisfazerem as exigências de um curativo ideal (NEEL et al., 2013; KANKPANONT et al., 2012). Dentre os benefícios associados as membranas bioativas destacam-se a prevenção da desidratação da ferida, aceleração da angiogênese, indução de epitelização, formação do tecido de granulação e proteção contra microrganismos do ambiente (KANKPANONT et al., 2012; LABOUTA & SCHNEIDER, 2013).

Dentre os materiais utilizados para confecção de membranas bioativas, destaca-se o colágeno hidrolisado (gelatina), que apresenta importante biocompatibilidade, bem como baixa toxicidade e imunogenicidade, além de o próprio colágeno ser capaz de estimular a proliferação de miofibroblastos, essencial para o processo de reparo tecidual da lesão (RUSZCZAK, 2003; HELARY et al., 2006). Ademais, estes polímeros naturais podem ter sua ação potencializada em decorrência da capacidade de incorporar fármacos de liberação controladas a estes materiais (LOSS et al., 2000; NICOLOSI & MORAES, 2005).

O Ácido Úsnico (AU) é um composto natural derivado de líquens, amplamente estudado, com importantes propriedades biológicas descritas em literatura. Dentre estas, destaca-se sua propriedade anti-inflamatória, cicatrizantes, antimicrobiana e antioxidante (BRUNO et al., 2013; FRANCOLINI et al., 2013; ARAÚJO et al., 2015). Dessa forma, o AU apresenta-se como um composto capaz de auxiliar na cicatrização das lesões características da LCL, bem como possui capacidade leishmanicida já descrita, atuando

sobre a membrana plasmática dos parasitos (FOURNET et al., 1997; DA LUZ et al., 2015). No entanto, o AU possui limitações em seu uso em decorrência de importante toxicidade hepática, bem como devida a sua baixa solubilidade em água. (FRANCOLINI et al., 2013).

Em decorrência da natureza anfifílica dos sistemas compostos por Lipossomos, este se apresenta como uma alternativa importante para o transporte de drogas que apresentam baixa solubilidade em água (DIMER et al., 2013). Tal propriedade, por sua vez, é decorrente da estrutura dos Lipossomos, constituídos de estruturas vesiculares compostas de camadas de lipídeos entremeadas por compartimentos aquosos (SIQUEIRA-MOURA et al., 2008). Ademais, estes sistemas também possuem a capacidade de oferecer uma dosagem mais adequada e uma melhor penetração da droga nos tecidos (FERREIRA & RANGEL, 2009).

O desenvolvimento de um tratamento de ação tópica para LCL constituída por Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em Lipossomo apresenta-se como uma alternativa terapêutica possivelmente viável, em decorrência do baixo custo associado a formulação, bem como pela capacidade do sistema atuando tanto no processo de combate ao parasito quanto na cicatrização tecidual. Desta forma, nossa hipótese é que o sistema composto por Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em Lipossomo seja capaz de reduzir a viabilidade parasitária *in vitro* de parasitos da espécie *Leishmania brasiliensis*.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

Avaliar o potencial *in vitro* do sistema composto por Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico como uma nova forma de tratamento para Leishmaniose Cutânea Localizada causada por isolado de *Leishmania braziliensis*.

2.3 Objetivos Específicos

- 2.3.1 Avaliação do efeito leishmanicida das Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo em culturas axênicas de *Leishmania braziliensis*.
- 2.3.2 Avaliação da citotoxicidade das Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo em macrófagos humanos
- 2.3.3 Avaliação do tratamento com Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo em macrófagos infectados por isolado de *Leishmania braziliensis*

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção e cultura de *Leishmania braziliensis*

O isolado de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) (DE MOURA et al., 2005) fora obtido através da parceria do presente grupo de pesquisa com a Fundação Oswaldo Cruz sediada na Bahia (FIOCRUZ-BA). A forma promastigota foi cultivada a 26°C, em meio Schneider (Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100ug/mL).

3.2 Obtenção das Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo

Para a preparação das Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo (M+AU) utilizou-se Ácido Úsnico (AU) (Sigma-Aldrich – 98%, cód. MKBC3299) e gelatina em pó (fornecedor NP Comércio de produtos alimentícios, lote LFP 9766). Para o preparo dos lipossomos, foi utilizada fosfatidilcolina a 75% (Lipoid GMBH 75% Lote 776095-1). As membranas foram preparadas no Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade (LeFT) da Universidade Federal de Sergipe, de acordo com o método descrito por Nunes et al. (2010). Prontas, as membranas foram recortas em disco por um *punch* para realização do ensaio *in vitro*, resultando na concentração de 0,4 µg de AU por membrana (Figura 1).

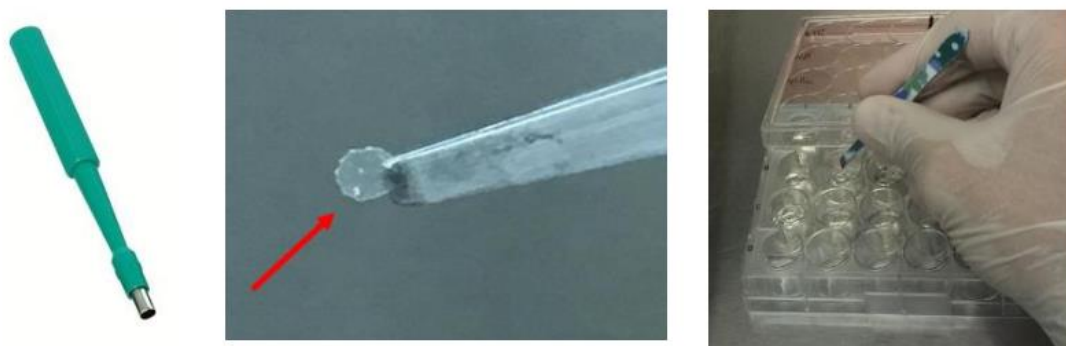


Figura 1. Recorte da Membrana de Gelatina para utilização nos ensaios *in vitro*.

3.3 Análise da viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* tratados com diferentes concentrações de Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo na Membrana de Gelatina

Promastigotas em crescimento exponencial foram semeadas em placas de cultura de 24 poços (Corning) na concentração de 1×10^6 parasitos por poço e então tratados com concentrações crescentes de AU (0,4, 0,8 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$). Como controle, foram utilizados também um grupo sem tratamento e um grupo tratado com Membranas de Gelatina pura. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa BOD por 48h, quando então o número de parasitos viáveis foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer.

3.4 Análise da viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* após o tratamento com diferentes concentrações de Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo na Membrana de Gelatina

Promastigotas em crescimento exponencial foram semeadas em placas de cultura de 24 poços (Corning) na concentração de 1×10^6 parasitos por poço e, então, tratados com concentrações diferente de AU (0,4, 0,8 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$). Como controle, foram utilizados um grupo sem tratamento e um grupo tratado com Membranas de Gelatina pura. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa BOD por 48h, quando então as membranas foram retiradas e a culturas lavadas extensivamente com solução salina (NaCl 0,9%) para retirada de droga residual da cultura. Novamente, as placas foram incubadas em estufa BOD, sendo a viabilidade parasitária determinada através de contagem direta por Câmara de Neubauer em 24 e 48h após a troca de meio.

3.5 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Amostras de sangue periférico foram obtidas de doadores humanos sadios e armazenadas em tubos graduados estéreis de 50mL, contendo solução anticoagulante heparina (100 μl / 10mL de sangue). A amostra, então, foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%) e aplicado sobre um gradiente de densidade, Ficoll Histopaque® (Sigma), na proporção de 3mL/10mL de sangue, em seguida, centrifugado a 400G durante 35 minutos a 24°C. Após a centrifugação, o anel contendo as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foi colhido da interface e as células foram lavadas com solução salina (NaCl 0,9%) duas vezes (450G por 10 minutos). As células então, foram ressuspensas

em 1mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Sigma), 1% de penicilina (100U/mL - Sigma) e estreptomicina (100µg/mL - Sigma), quantificadas e distribuídas em placas de cultura de 24 ou 48 horas (Corning) na concentração de 4×10^5 células/poço, em seguida, sendo incubadas por 2 horas em estufa BOD 5% de CO₂ a 37°C. Após as 2 horas, as células não aderentes foram retiradas através de lavagem com solução salina (NaCl 0,9%) enriquecida com 1% de Soro Fetal Bovino (Sigma) e novamente incubadas por 5 dias para diferenciação em macrófagos.

3.6 Análise da infecção de macrófagos humanos e da carga parasitária obtidos de PBMC tratados com o sistema de Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo

Após o processo de separação, as células mononucleares foram depositadas em cima de lamínulas de vidro no fundo de placas de 24 poços e encubadas para diferenciação. No quinto dia, os macrófagos infectados por promastigotas em fase estacionária na proporção de 1:10 e encubadas (37°C, 5% CO₂) novamente pelo período de 24 horas. Após este período, as culturas foram tratadas com Membrana de Gelatina Pura e Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo por 24h e 48h e então as lamínulas foram lavadas e coradas por hematoxilina e eosina (H&E). O número de células infectadas e de amastigotas por 100 macrófagos foram avaliadas por microscopia ótica por dois investigadores independentes e cegos para o tratamento.

3.7 Avaliação da viabilidade dos parasitos intracelulares após o tratamento com o sistema de Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo

Após o processo de separação, as células polimorfonucleares foram depositadas no fundo de placas de 24 poços e encubadas para diferenciação. No quinto dia, os macrófagos infectados por promastigotas em fase estacionária na proporção de 1:10 e encubadas (37°C, 5% CO₂) novamente pelo período de 24 horas. Após este período, as culturas foram tratadas com sistema de Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo por 24 e 48h. Após este período, o meio RPMI foi trocado pelo meio de cultura Schneider e então as placas foram encubadas em estufa BOD a 24°C. O número de parasitos viáveis foi determinado por contagem direta em câmara de

Neubauer nos 5º e 7º dias após a troca do meio de cultura (Protocolo adaptado Santos et al., 2014).

3.8 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão (EP). O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para análise da normalidade. Para comparação de três ou mais grupos foi utilizado ANOVA com os pós-testes de Dunnett's, linear trend ou Bonferroni (testes paramétricos). Para os dados não paramétricos, as comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste Mann-Whitney. Todos os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 5, San Diego, EUA. Para todas as análises um $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

3.9 Aspectos Éticos

O presente projeto possui aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (CEP-HU-UFS), sob o número do CAAE: 92197218.8.0000.5546.

4 RESULTADOS

4.1 Tratamento com Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo reduz a viabilidade do isolado de *L. braziliensis*.

Inicialmente, buscou-se avaliar o comportamento do isolado de *L. braziliensis* quando exposto ao sistema de Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo (M+AUl). Para isso, o isolado foi exposto tanto a Membrana de Gelatina pura (M0) quanto a apresentação M+AUl contendo diferentes concentrações de Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo.

Conforme observa-se na Figura 1, ao se comparar o grupo controle com os grupos tratados com o Sistema M0 e M+AUl, observamos que não houve redução significativa da viabilidade parasitária no tratamento com M0, ao passo que observamos reduções de 75,1%, 87,7% e 98,8% da viabilidade parasitária com as concentrações de 0,4, 0,8 e 2,0 µg/mL, respectivamente, de Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo. Ou seja, observamos que o sistema M+AUl reduz a viabilidade parasitária de forma dose-dependente, em que quanto maior a concentração, menor é a viabilidade do parasito.

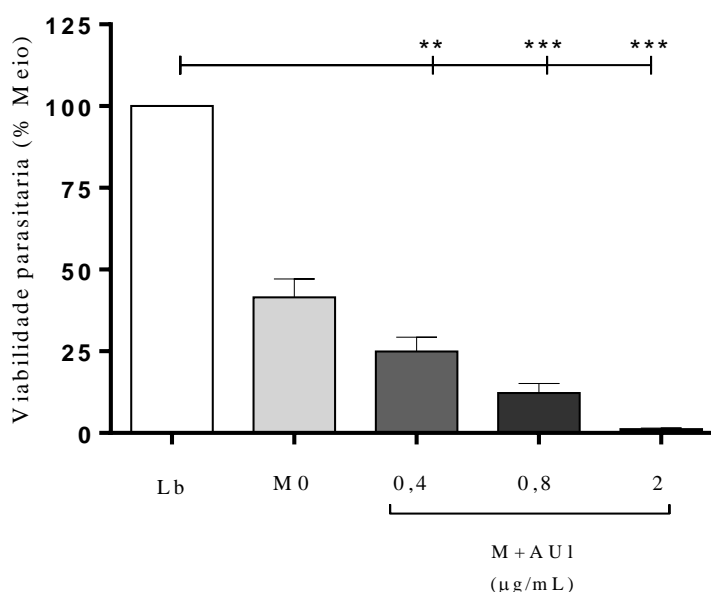


Figura 2. Tratamento da cultura axênica com Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo. O isolado de *L. braziliensis* foi exposto ao tratamento com Membrana de Gelatina pura e com crescentes concentrações de AU encapsulado em lipossomo por 48 horas, quando

então a viabilidade parasitária foi determinada por contagem direta em Câmara de Neubauer. É possível observar que o tratamento Membrana de Gelatina contendo AU encapsulado em lipossomo apresentou menor viabilidade parasitária quando comparada ao grupo controle, bem como um efeito dose dependente no que diz respeito a concentração de AU na cultura. O gráfico representa as médias e o \pm EP de 3 experimentos realizados em quintuplicata (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

4.2 Tratamento com Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo reduz de forma irreversível a viabilidade do isolado de *L. braziliensis*

Tendo em vista que o tratamento com o sistema M+AUl é eficiente para redução da viabilidade parasitária do isolado de *L. braziliensis*, buscou-se então avaliar se este efeito ocorre de forma irreversível ou somente durante a exposição do parasito ao tratamento. Para isso, após 48h de exposição ao sistema M+AUl, as culturas foram lavadas extensivamente para retirada de qualquer resíduo de droga.

Conforme se observa na Figura 3, o grupo de parasitos que foi tratado com a M0 apresentou redução de 23,8% e de 30,9% de sua viabilidade quando comparado ao grupo sem tratamento após 24 e 48 horas de retirada do tratamento. Já no que diz respeito ao grupo tratado com 0,8 mg/mL de Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo na apresentação M+AUl, observa-se reduções de 68,3% e 85,6% da viabilidade dos parasitos, nestes mesmos tempos, respectivamente, quando comparado ao grupo sem tratamento.

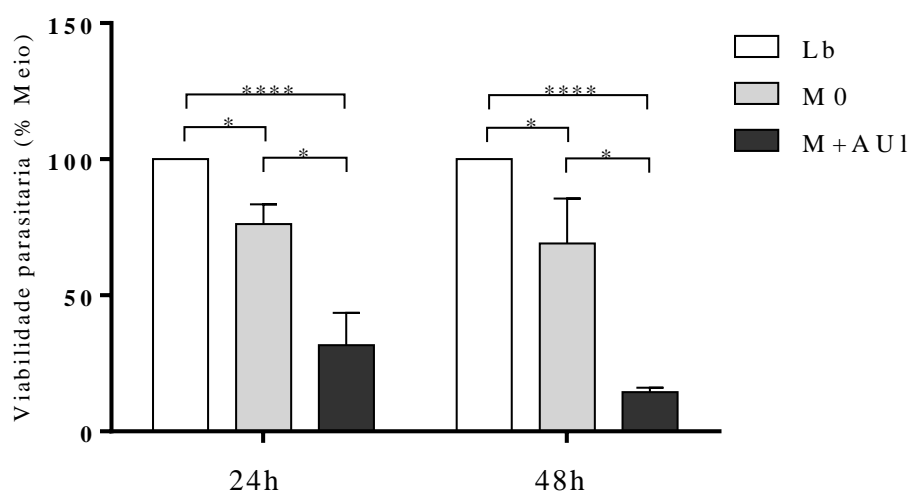


Figura 3. Efeito após o tratamento de cultura axênica com Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo. O isolado de *L. braziliensis* fora exposto ao tratamento com Membrana

de Gelatina pura e com AU por 48h, quando então a cultura fora lavada para retirada de droga residual e, então, a viabilidade parasitária após 24h e 48h da lavagem foi determinada por contagem direta em Câmara de Neubauer. É possível observar que na cultura tratada com a Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo, houve uma menor viabilidade parasitária mesmo após a lavagem da cultura. O gráfico representa as médias e o \pm EP de 3 experimentos realizados em triplicata. (* $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$)

Dessa forma, é possível afirmar que o tratamento com a M0 apresenta um efeito irreversível na redução da viabilidade parasitária do isolado BA788, além do mais, este efeito pode ser potencializado quando se associa o AU encapsulado em lipossomo a Membrana de Gelatina.

4.3 Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo não apresenta citotoxicidade em macrófagos humanos

Apesar de o sistema de M+AUl mostrar-se eficiente na redução da viabilidade parasitária do isolado de *L. braziliensis*, fez-se necessário avaliar se esta formulação apresentaria ou não toxicidade para células humanas. Frente a isto, buscou-se avaliar se o sistema M+AUl apresenta significativa citotoxicidade em macrófagos humanos obtidos por PBMC.

Para isto, macrófagos humanos foram expostos a diferentes concentrações de AU no sistema de M+AUl nos tempos de 24 e de 48 horas. Independentemente da concentração de AU ou do tempo de exposição ao tratamento proposto, não fora observada redução da viabilidade celular (Figura 4). Desta forma, pode-se concluir que o sistema de M+AUl não apresenta toxicidade em macrófagos humanos.

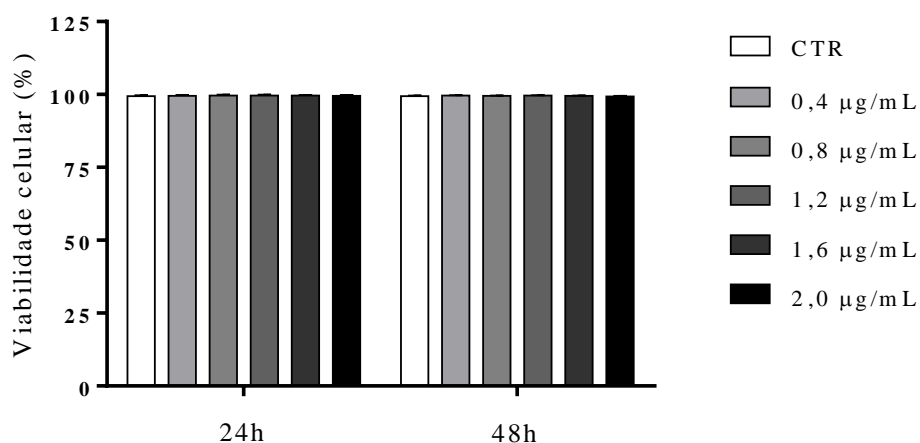


Figura 4. Citotoxicidade de macrófagos humanos tratados com o sistema de Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo. Macrófagos humanos obtidos de PBMC foram expostos a concentrações crescentes de Ácido Usnico por 24 e 48 horas, quando então a viabilidade foi determinada por contagem diferencial por Azul Trypan. Em todos tratamentos realizados, não fora observada redução significativa da viabilidade dos macrófagos. O gráfico representa as médias e o erro padrão de média \pm EP de 7 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.4 Tratamento com Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo reduz a taxa de infecção por *L. braziliensis* em macrófagos humanos

Tendo em vista que o sistema de M+AUl apresenta-se eficiente na redução da viabilidade parasitária, bem como não possui toxicidade significativa em macrófagos humanos, buscou-se, então, avaliar como se comportam macrófagos infectados pelo isolados de *L. braziliensis* tratados com o presente sistema. Para isto, Macrófagos humanos obtidos de PBMC foram infectados pelo isolado estudado e, então, expostos ao tratamento com o sistema M+AUl pelos tempos de 24 e 48 horas, quando fora determinada a quantidade de macrófagos infectados e a taxa de infecção através da contagem de lamínulas coradas por H&E através da microscopia ótica.

No que diz respeito a quantidade de macrófagos infectados após o tratamento, nota-se que somente no tratamento com M+AUl foi observada uma menor quantidade de macrófagos infectados tanto no tempo de 24 horas quanto no de 48, com uma queda de, aproximadamente, 44 e 45%, respectivamente, quando comparados ao grupo sem tratamento (Figura 5A). Comportamento semelhante foi observado no que diz respeito a taxa de infecção, em que se observa uma queda de 54 e 53%, aproximadamente, quando compara-se o grupo tratado com o sistema M+AUl ao grupo sem tratamento nos dois tempos avaliados, respectivamente (Figura 5B). A Figura 5C, por sua vez, apresenta fotos representativas das menores taxas de infecção observadas no tratamento com o sistema de M+AUl.

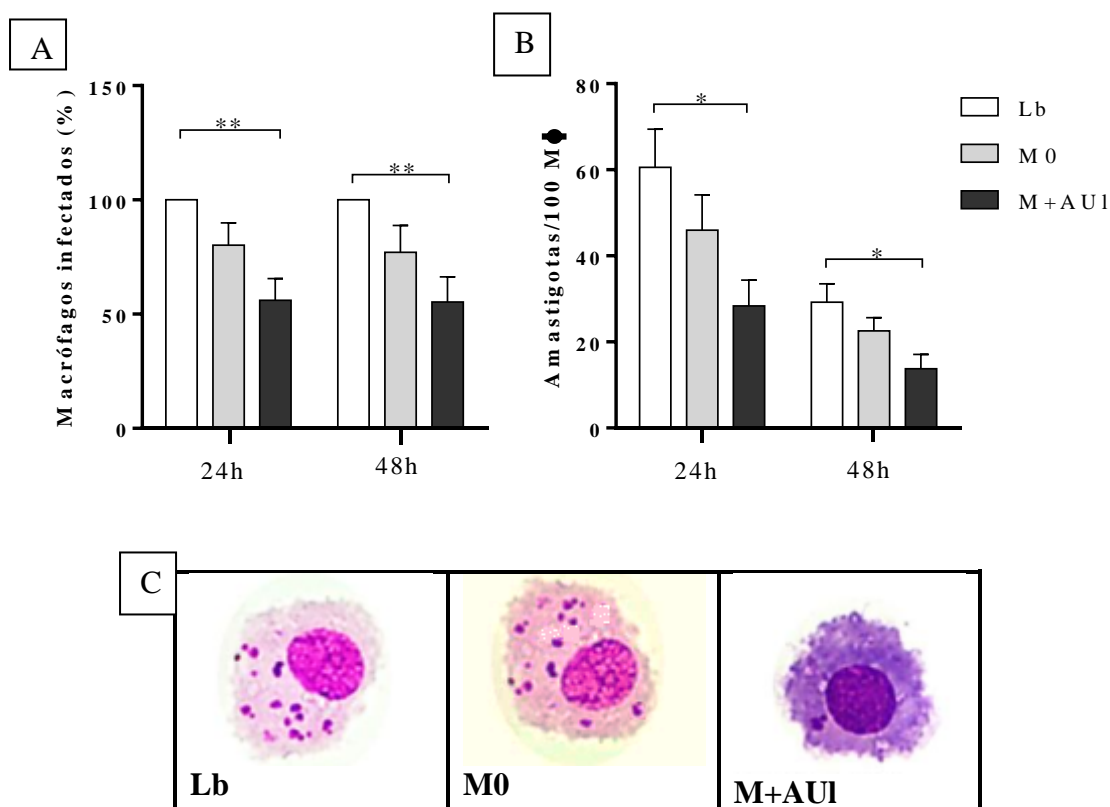


Figura 5. Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo no tratamento de macrófagos infectados por isolado de *L. braziliensis*. Macrófago humanos obtidos por PBMC foram expostos ao isolado de *L. braziliensis* na proporção de 1:10 pelo período de 24 horas, quando então as culturas foram expostas ao tratamento com Membrana de Gelatina pura e com AU por 24 e 48 horas, quando se avaliou a quantidade de macrófagos infectados e a taxa de infecção por microscopia ótica. Observa-se que tanto no tratamento de 24 horas quanto no de 48 horas, o tratamento com o sistema M+AU1 houve uma menor quantidade de macrófagos infectados (A). Padrão semelhante, por sua vez, é observado no que diz respeito a taxa de infecção dos macrófagos nos dois tempos avaliados (B). Imagens representativas de macrófagos nos tratamentos avaliados (C). Os gráficos representam as médias e o \pm EP de 9 experimentos realizados em duplicata. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$)

Muito embora, o tratamento com M+AU1 seja capaz de reduzir o número de macrófagos infectados, bem como a taxa de infecção, a contagem por microscopia ótica de lamínulas coradas por H&E, apresenta limitação no que diz respeito a viabilidade parasitária. Isso se deve ao fato de, apesar de ser capaz de definir a taxa de infecção, não é possível definir a viabilidade dos parasitos encontrados nos macrófagos. Frente a isso, realizou-se em paralelo a cultura de macrófagos infectados após os tratamentos propostos no meio Schneider. Tendo em vista o fato de este ser um meio propício para o crescimento do parasito, pode-se, assim, avaliar a quantidade de parasitos que permaneceram viáveis mesmo após os tratamentos realizados através da expansão da cultura nos dias seguintes.

Quanto aos grupos que foram tratados por 24 horas, observa-se que o grupo tratado com o sistema de M+AUl apresentou uma menor expansão da cultura parasitária ao final do 5º e 7º dias pós tratamento, com um crescimento, respectivamente, 66,6% e 65,8% menor quando comparado ao grupo que não recebeu tratamento (Figura 6A). Comportamento semelhante, por sua vez, foi observado nos grupos tratados pelo período de 48 horas, onde o grupo tratado com o sistema M+AUl apresentou crescimento 60,8% e 65,5% menor que o grupo sem tratamento ao final do 5º e do 7º dia pós tratamento, respectivamente (Figura 6B).

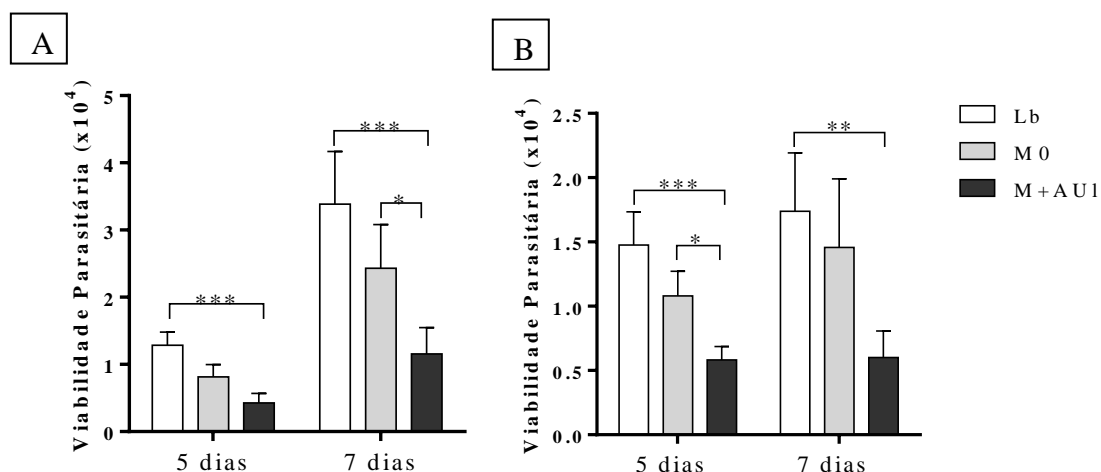


Figura 6. Avaliação da viabilidade parasitária após o tratamento de macrófagos infectados com o sistema de Membrana de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo. Macrófago humanos obtidos por PBMC foram expostos ao isolado de *L. braziliensis* na proporção de 1:10 pelo período de 24 horas, quando então as culturas foram expostas ao tratamento com Membrana de Gelatina pura e com AU por 24 e 48 horas. Após cada período, fora trocado o meio das culturas para o meio Schneider, propiciando o crescimento dos parasitos viáveis, quando aos 5º e 7º dias após a troca do meio, viabilidade parasitária foi determinada por contagem direta em Câmara de Neubauer. Tanto no tratamento com 24h (A) quanto no de 48 horas (B), observou-se uma menor viabilidade parasitária no tratamento com o sistema M+AUl. Os gráficos representam as médias e o \pm EP de 8 experimentos realizados em duplicata. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

Diante do exposto, pode-se constatar que além de reduzir a quantidade de macrófagos infectados e a taxa de infecção, o tratamento com o sistema M+AUl é capaz de reduzir a viabilidade dos parasitos que são encontrados dentro dos macrófagos infectados, ou seja, uma irreversibilidade do efeito leishmanicida com o tratamento proposto.

5 DISCUSSÃO

Embora a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) seja uma doença bem localizada no organismo, com o parasito infectando macrófago da camada dérmica da pele, o tratamento de primeira linha, atualmente, corresponde a utilização de drogas Antimoniais Pentavalentes (SB^V) (BOCXLAER et al., 2016; CHULAY et al., 1988). Estas drogas, além de serem administradas via parenteral, estão associadas com significativa toxicidade sistêmica, acometendo órgãos como coração, rins e fígado (AMATO et al., 2007; HANDJANI et al., 2017).

Em buscas de alternativas menos tóxicas para o tratamento da LCL, diversas drogas vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos. Dentre estas, destaca-se o 17-AAG, um inibidor da HSP-90, que apresentou importante redução da viabilidade parasitária de parasitos da espécie *L. braziliensis* tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* em modelos murinos (SANTOS et al., 2014). No entanto, o que se observa, principalmente, é o estímulo para o desenvolvimento de tratamentos localizados para LCL (OMS, 2013).

Dentro deste contexto, diversas formulações de tratamentos tópicos para LCL foram desenvolvidas, compreendendo desde pomadas e géis até tratamento com crio e fototerapias (ARANA et al., 2001; BRYCESON et al., 1994; DOS SANTOS et al., 2008; PARIZI et al., 2015; AURELIANO et al., 2018). Muito embora nenhuma formulação ainda tenha se apresentado como uma alternativa capaz de substituir o tratamento de primeira linha atualmente empregado. Isto, por sua vez, ocorre por diversas razões, dentre elas, a incapacidade de esses tratamentos se mostrarem mais eficientes que o uso dos antimoniais, o fato de possuírem efeitos colaterais bastante significativos, ou mesmo ainda estarem em fases bastante precoces de desenvolvimento (LAYEGH et al., 2011; NEAL et al., 1994).

As formulações de sistemas de Membranas para o tratamento da LCL ainda é campo com pouco desenvolvimento, sendo encontrados escassos dados na literatura. Uma revisão sistemática desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa sobre tratamentos tópicos da LCL em fases de ensaio clínico, mostrou somente um trabalho que fazia o uso de sistemas de Membranas para o tratamento da LCL (dados ainda não publicados). Fora deste tipo de estudo, ao avaliarmos estudos *in vitro* e *in vivo* em modelos murinos, já fora demonstrada a eficiência de Membranas de Celulose contendo DETC, um quelante de

cobre, para o tratamento da LCL (CELES et al., 2016). Esta formulação, no entanto, assim como outras, ainda se encontra em fases iniciais de desenvolvimento.

O sistema de Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em Lipossomo (M+AU), por sua vez, já vem sendo estudado para o tratamento de queimaduras, tendo em vista a capacidade anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana, dentre outras, deste sistema, contando inclusive com ensaios clínicos em humanos já em andamento (BRUNO et al., 2013; FRANCOLINI et al., 2013; ARAÚJO et al., 2015). Associando isto à capacidade que o Ácido Úsnico possui em apresentar efeito leishmanicida, o presente sistema apresenta-se assim como uma alternativa viável de ser estudada para o tratamento da LCL (DA LUZ et al., 2015).

Buscamos avaliar o comportamento de culturas axênicas do isolado de BA788 de *L. braziliensis* frente ao tratamento com Membrana de Gelatina pura (M0) e com diferentes concentrações de AU encapsulados em Lipossomos adsorvidos no sistema de Membrana de Gelatina (M+AU). Foi obtida uma menor viabilidade parasitária nos tratamentos com membrana quando associada ao AU, segundo um efeito dose dependente de redução da viabilidade parasitária. O efeito leishmanicida do AU, também de caráter dose dependente, já fora demonstrado em estudos *in vitro* para outras espécies do gênero *Leishmania*, como a *L. major* e *L. tropica*, que causam a forma tegumentar da doença e também para a *L. infantum* responsável pela forma visceral, bem como para o tratamento da *L. braziliensis*, espécie de estudo do presente trabalho (DERECI et al., 2018; FOURNET et al., 1997).

Além do efeito dose dependente, destaca-se que no presente experimento, já é possível observar redução da viabilidade parasitária na concentração de 0,4 µg/mL de AU. Em contrapartida, em outros trabalhos que avaliaram o uso isolado do AU, esta redução só fora demonstrada na concentração de 10 µg/mL, ou seja, uma concentração 25 vezes maior do que a encontrada no presente estudo (FOURNET et al., 1997). Desta forma, observa-se uma potencialização no efeito do AU quando este se encontra encapsulado em lipossomo e associado ao sistema de Membranas de Gelatina. Tal potencialização, por sua vez, pode ser justificada pelas propriedades associadas a natureza anfifílica do sistema lipossomal (SIQUEIRA-MOURA et al., 2008).

Dentre os mecanismos de ação do AU que justificam a redução a viabilidade parasitária no presente experimento, destaca a sua capacidade de atuar diretamente na membrana plasmática de parasito do gênero *Leishmania*, causando, assim, dano a esta e, consequentemente, levando a morte dos parasitos (DA LUZ et al., 2015). Além disso, o AU age reduzindo a viabilidade de parasitos do gênero *Leishmania* ao reduzir a replicação destes, bem como ao promover a apoptose, induzindo a expressão genes pró-apoptóticos, como *p53*, *Bax*, *Casp-3* e *Casp-9* e suprimindo a de *Bcl-2*, de propriedade anti-apoptótica (DERECI et al., 2018).

Tendo em vista que o sistema M+AU1 apresenta-se eficiente na redução da viabilidade parasitária, buscamos então avaliar se a ação do presente tratamento é irreversível nestes parasitos. Neste experimento, observamos que os parasitos apresentam menor expansão parasitária comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com a M0 quando foram tratados com a menor concentração testada (0,8 µg/mL) de AU no Sistema M+AU1. Situação semelhante, mas com menor eficiência, foi observado no tratamento com a M0, muito embora, mesmo quando comparado a esse grupo, a expansão da cultura foi ainda menor no grupo tratado com o Sistema M+AU1. Dessa forma, podemos concluir que o efeito da redução da viabilidade parasitária é irreversível tanto no tratamento com a M0 quanto com o Sistema M+AU1, sendo ainda mais eficiente neste último grupo.

Outros trabalhos da literatura já avaliaram o potencial terapêutico do AU para outras parasitoses causadas por protozoários das espécies *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*, agentes etiológicos da Malária e da Toxoplasmose, respectivamente (PASTRANA-MENA et al., 2016; SI et al., 2016). No que diz respeito aos parasitos de *T. gondii*, o tratamento com AU é capaz de promover modificações ultra estruturais no parasito, alterando principalmente a arquitetura das organelas citoplasmáticas (SI et al., 2016). Já no que diz respeito às Leishmanioses, também foi demonstrado que o tratamento com AU promove alterações ultra estruturais, tanto membranosas quanto citoplasmáticas, nos parasitos da espécie *L. infantum* (DA LUZ et al., 2015).

Diante disto, é possível que alterações ultra estruturais também possam ter acontecido nos parasitos de *L. braziliensis* testados no presente experimento, justificando assim a menor expansão da cultura do grupo de parasitos tratados com o sistema M+AU1. Isto, por sua vez, decorre do fato de que, por apresentarem possíveis alterações na arquitetura das organelas citoplasmáticas e, consequentemente, das funções destas, estes

parasitos podem ter funções importantes para manutenção de sua viabilidade, como a replicação, comprometidas. Somado a isto, é possível que a modificação na expressão de genes pró e antiapoptóticos decorrentes da ação do AU ainda possam estar comprometendo a viabilidade e a capacidade de replicação destes parasitos.

Com base nos dados expostos até o momento, o sistema M+AUl apresenta-se como uma alternativa promissora para o tratamento da LCL, tendo em vista sua capacidade em reduzir a viabilidade dos parasitos. No entanto, faz-se necessária a avaliação da toxicidade do presente tratamento para células humanas. Isto, por sua vez, decorre do fato de que para instituição de qualquer forma de tratamento no rol terapêutico para as mais diferentes doenças, uma importante limitação corresponde a toxicidade desta ao organismo humano. No que diz respeito a LCL, as drogas utilizadas como primeira linha de tratamento, os antimoniais pentavalentes (SB^V), apresentam significativa toxicidade hepática, cardíaca e renal (SINGH et al., 2014).

No presente estudo, o sistema de M+AUl não apresentou toxicidade em todas concentrações testadas de AU em macrófagos humanos, importante componente do sistema imunológico. Em outros estudos que avaliaram o uso isolado do AU, em contrapartida, foi demonstrada toxicidade para fibroblastos murinos e linfócitos humanos, de acordo com um efeito dose dependente, em ensaios *in vitro* (KOPARAL et al., 2006). No entanto, convém destacar que a máxima concentração testada no presente estudo corresponde a menos de um terço da menor concentração avaliada no referido trabalho. Ademais, na formulação de M+AUl, testada no presente estudo, o AU se encontra encapsulado em estruturas de lipossomos, que, por sua vez, ao promoverem a liberação controlada do composto, minimizam, em última instância, os seus efeitos tóxicos sobre as células humanas.

É possível que os mecanismos pelos quais o AU compromete a viabilidade parasitária possam, em certo grau, influenciar na toxicidade celular. No entanto, descritos em literatura, destacam-se a indução do estresse oxidativo e a redução da função das mitocôndrias como mecanismos associados a toxicidade celular do AU (HAN et al., 2004). Apesar disto, uma revisão de literatura publicada pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que não é possível fazer conclusões no que diz respeito a toxicidade do AU (ARAUJO et al., 2015). No entanto, o uso da M+AUl já mostrou resultados promissores

em diversos trabalhos, entre eles no que diz respeito ao tratamento de lesões cutâneas decorrentes de queimaduras (NUNES, 2016).

Tendo em vista que o sistema M+AUl é eficiente na redução da viabilidade parasitária, bem como se apresenta como uma formulação segura frente aos macrófagos humanos, buscou-se então avaliar o comportamento do presente sistema frente aos macrófagos infectados pelo isolado de *L. braziliensis*. No presente estudo, foi demonstrado que o sistema de M+AUl é capaz de reduzir a invasão dos parasitos nos macrófagos, ao apresentar tanto menor quantidade de macrófagos infectados bem como menor carga parasitária, além de exercer um efeito irreversível no comprometimento da viabilidade dos parasitos após a exposição.

Embora sejam escassos na literatura estudos que avaliem o uso do AU no tratamento *in vitro* de infecções por parasitos do gênero *Leishmania*, já fora demonstrada a capacidade deste composto de comprometer a infecção celular dos protozoários das espécies *Toxoplasma gondii* e *Trypanossoma cruzi*, (SI et al., 2016; DE CARVALHO et al., 2005). No que diz respeito ao *T. cruzi*, fora demonstrado que o AU é capaz de realizar alterações ultra estruturais no parasito, promovendo vacualização intracelular e desorganização mitocondrial, embora preserve a integridade da célula hospedeira (DE CARVALHO et al., 2005).

Tendo em vista o AU já foi descrito como capaz de realizar modificações ultra estruturais na arquitetura citoplasmática e organelar em culturas axênicas de parasitos do gênero *Leishmania*, bem como a capacidade deste composto ser capaz de promover modificações semelhantes na infecção por outros parasitos (DA LUZ et al., 2015). Dessa forma, é possível sugerir que alterações similares possam acontecer nos parasitos de *L. braziliensis* infectantes no presente experimento. Isto, por sua vez, se reflete na menor invasão e viabilidade parasitária no tratamento com o sistema M+AUl.

Na literatura, são poucos os trabalhos que avaliam a ação do AU em experimentos *in vivo* tanto em modelo animal quanto em seres humanos. No entanto, já fora demonstrada a capacidade de o AU, quando aplicado de forma intralesional, ser capaz de reduzir tanto o tamanho quanto a carga parasitária das lesões de camundongos infectados por *L. amazonensis* (FOURNET et al., 1997). Já no que diz respeito ao Sistema de M+AUl, este já se mostrou eficiente no tratamento de lesões de queimaduras em modelos suínos,

com melhor celularidade, epitelização e deposição de colágeno, além de indicar boa absorção do AU no sistema (NUNES et al., 2016).

6 CONCLUSÕES

Tendo como base os experimentos *in vitro* realizados, é possível concluir que o sistema M+AUl é uma formulação com eficaz poder leishmanicida e segura para células humanas. Dessa forma, o presente sistema apresenta-se como uma alternativa viável para opção terapêutica no tratamento LCL causada por parasitos da espécie *Leishmania braziliensis*.

7 PERSPECTIVAS DE FUTUROS TRABALHOS

Apesar disto, ainda são necessários maiores estudos a respeito do sistema de M+AUl como opção terapêutica, expandindo os experimentos para avaliar sua eficácia em estudos com modelos *in vivo em* animais e, futuramente, humanos controlados. Estes pontos, por sua vez, apresentam-se como perspectivas futuras do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

AMATO, Valdir Sabbaga et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266-274, 2007.

ARANA, Byron A. et al. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 466-470, 2001.

ARAUJO, A. A. S. et al. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. **Natural product research**, v. 29, n. 23, p. 2167-2180, 2015.

AURELIANO, Débora P. et al. Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 23, p. 1-8, 2018.

BAÑULS, Anne-Laure; HIDE, Mallorie; PRUGNOLLE, Franck. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in parasitology**, v. 64, p. 1-458, 2007.

BEN SALAH, Afif et al. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 6, p. 524-532, 2013.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical infectious diseases**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BITTENCOURT, Achiléa et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis associated with AIDS. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. 313-316, 2002

Brasil. DataSUS. Disponível em: <
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>>. Acesso em 12 de maio de 2019.

BRUNO, Michela et al. (+)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1834-1843, 2013.

BRYCESON, Anthony DM; MURPHY, Anthony; MOODY, Anthony H. Treatment of 'Old World' cutaneous leishmaniasis with aminosidine ointment: results of an open study in London. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 226-228, 1994.

CELES, Fabiana S. et al. DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific reports**, v. 6, p. 38330, 2016.

CHULAY, J. D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 69-72, 1988.

DA LUZ, João SB et al. Ultrastructural analysis of leishmania infantum chagasi Promastigotes forms treated in vitro with usnic acid. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

DAIE PARIZI, Mohammad Hossein et al. The topical treatment of anthroponotic cutaneous leishmaniasis with the tincture of thioxolone plus benzoxonium chloride (Thio-B en) along with cryotherapy: a single-blind randomized clinical trial. **Dermatologic therapy**, v. 28, n. 3, p. 140-146, 2015.

DANTAS-TORRES, Filipe. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: Leishmania infantum versus Leishmania infantum chagasi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 929-930, 2006.

DAVID, Consuelo V.; CRAFT, Noah. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

DE CARVALHO, E. A. B. et al. Effect of usnic acid from the lichen Cladonia substellata on Trypanosoma cruzi in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, v. 36, n. 2, p. 155-161, 2005.

DE MOURA, T.R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun.**, v. 73, p. 5827-5834, 2005.

DERICI, Mehmet Kürşat; CANSARAN-DUMAN, Demet; TAYLAN-ÖZKAN, Ayşegül. Usnic acid causes apoptotic-like death in *Leishmania major*, *L. infantum* and *L. tropica*. **3 Biotech**, v. 8, n. 9, p. 384, 2018.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química. Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases initiative. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl.html>>. Acesso: 01 dez. 2018

DOS SANTOS, Aline Marques et al. Effect of a hydrophilic formulation of topical paromomycin on cutaneous leishmaniasis among patients with contraindications for treatment with pentavalent antimonials. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 444-448, 2008.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. D. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FOURNET, Alain et al. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 51-54, 1997.

FRANCOLINI, Iolanda et al. Water soluble usnic acid-polyacrylamide complexes with enhanced antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis*. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 4, p. 7356-7369, 2013.

GONZÁLEZ, Urbà et al. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, n. issue, p. CD005067, 2008.

HAN, Derick et al. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. **Biochemical pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 439-451, 2004.

HANDJANI, Farhad et al. Interleukin-10 and Interferon- γ Levels in Patients with Cutaneous Leishmaniasis Treated with Cryotherapy. **Iranian journal of medical sciences**, v. 42, n. 5, p. 488, 2017.

HANDMAN, Emanuela. Cell biology of Leishmania. **Advances in parasitology**, v. 44, p. 1-39, 1999.

HELARY, C.; OVTRACHT, L.; COULOMB, B.; GODEAU, G.; GIRAUD-GUILLE, M. M. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behavior during wound healing. **Biomaterials**, v.27, n.25, p.4443-4452, 2006.

JIRMANUS, Lara et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 3, p. 426-433, 2012.

KANOKPANONT, Sorada et al. An innovative bi-layered wound dressing made of silk and gelatin for accelerated wound healing. **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1, p. 141-153, 2012.

KOPARAL, A. T.; AYAZ TÜYLÜ, B.; TÜRK, H. In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (–)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. **Natural product research**, v. 20, n. 14, p. 1300-1307, 2006.

LABOUTA, Hagar I.; SCHNEIDER, Marc. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 1, p. 39-54, 2013.

LAYEGH, Pouran et al. Efficacy of topical liposomal amphotericin B versus intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of parasitology research**, v. 2011.

LOSS, M. et al. Artificial skin, split-thickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93% of TBSA. **Burns**, v. 26, n. 7, p. 644-652, 2000.

MEARS, Emily Rose et al. A review: The current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003889, 2015.

MENDONÇA, Mitzi G. et al. Persistence of Leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, 2004.

NEAL, R. A. et al. Aminosidine ointments for the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 223-225, 1994.

NEEL, Ensanya A. Abou et al. Collagen—emerging collagen based therapies hit the patient. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 4, p. 429-456, 2013.

NICOLOSI, J. G.; MORAES, A. M. Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: Estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados. **VI Cobeq**. 2005.

NUNES, Paula S. et al. Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 3, p. 1011-1014, 2010.

NUNES, Paula Santos et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International journal of pharmaceutics**, v. 513, n. 1-2, p. 473-482, 2016.

PASTRANA-MENA, Rebecca et al. A malaria transmission-blocking (+)-usnic acid derivative prevents Plasmodium zygote-to-ookinete maturation in the midgut. **ACS chemical biology**, v. 11, n. 12, p. 3461-3472, 2016.

RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, p.1595-1611, 2003.

SANTOS, Diego M. et al. Chemotherapeutic potential of 17-AAG against cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3275, 2014.

SCHUBACH, Armando et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of Leishmania (Viannia) braziliensis persistence and viability eleven years

after antimonial therapy and clinical cure. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 6, p. 824-827, 1998.

SHKLIAR, I. I. Treatment of trichomoniasis in men with antibiotics-sodium salt of usnic acid. **Vestnik dermatologii i venerologii**, v. 42, n. 4, p. 89, 1968.

SI, Kaiwei et al. Effects of (+)-usnic acid and (+)-usnic acid-liposome on *Toxoplasma gondii*. **Experimental parasitology**, v. 166, p. 68-74, 2016.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 111, n. 8, p. 512-516, 2016.

SILVA, Rosiana Estéfane da et al. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 512-516, 2016.

SIQUEIRA-MOURA, M.; LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Braz J Pharm Sci**, 2008.

VAN BOCXLAER, Katrien et al. Drug permeation and barrier damage in *Leishmania*-infected mouse skin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 6, p. 1578-1585, 2016.

WEI, L. L. et al. In vitro effect of (+)-usnic acid on *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, v. 26, n. 6, p. 438-441, 2008.

WHO. 2013. Control of the Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 17 Nov 2017.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**, 2016.

WHO. Unveiling the neglect of Leishmaniasis. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/Unveiling_the_neglect_of_leishmaniasis_infographic.pdf?ua=1>. Acesso: 01 dez de 2018.

ATIVIDADES REALIZADAS DE AGOSTO/18 A JULHO/19

- Revisão de literatura;
- Ensaio de sensibilidade de promastigotas a Membrana de Galtina com Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo;
- Avaliação da viabilidade de promastigotas após o tratamento com Membrana de Gelatina com Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo;
- Investigação da citotoxicidade das Membranas de Gelatina contendo Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo;
- Avaliação da carga parasitária em macrófago tratados por Membrana de Gelatina com Ácido Úsnico encapsulado em lipossomo.

OUTRAS ATIVIDADES

- Capacitação em atividades do laboratório;
- Participação semanal nas reuniões científicas do grupo de pesquisa;
- Cultivo de isolados de *L. braziliensis*;
- Manutenção e cultivo de linhagem celular;
- Auxílio a outros estudantes de pós-graduação do laboratório no desenvolvimento dos seus experimentos;
- Comissão Organizadora do Minicurso de Técnicas Imunológicas;
- Apresentação do presente projeto no IV Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas em Setembro, 2018;
- 2º Lugar no Prêmio Destaque (Área Ciências Biológicas) pelo desenvolvimento e apresentação de trabalho no 28º Encontro de Iniciação Científica da UFS;
- 3º Lugar de melhor trabalho apresentado na V SEMAC do DME
- Publicação de 2 artigos científicos em revistas nacionais